

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1942

THESE

N° 333

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Yvonne SIMONOT

Née le 17 Juin 1913, à Paris.

— 2 DEC 1942

Présentée et soutenue publiquement le 19 ..

**INFLUENCE DE LA TURBIDITÉ
DANS LES MESURES COLORIMÉTRIQUES**

Application à l'évaluation
de la bilirubine dans le sérum sanguin

TRAVAIL DE LA CLINIQUE MÉDICALE DE L'HOTEL-DIEU
(Service du Professeur Noël FIESSINGER)

Président : M. FIESSINGER, Professeur.

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, Rue Deparcieux, 29
1942

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat: **SIMONOT.**

Prénom : **Yvonne.**

Date de la soutenance:

Numéro d'ordre:

(Ces deux mentions seront complétées par le service de la Bibliothèque)

SIMONOT (Yvonne). — Influence de la turbidité dans les mesures colorimétriques; Application à l'évaluation de la bilirubine dans le sérum sanguin. — Paris, Imp. R. Foulon, 1942, in-8°, 76 p., 15 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1942, N°)

SIMONOT (Yvonne). — Influence de la turbidité dans les mesures colorimétriques; Application à l'évaluation de la bilirubine dans le sérum sanguin. — Paris, Imp. R. Foulon, 1942, in-8°, 76 p., 15 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1942, N°)

SIMONOT (Yvonne). — Influence de la turbidité dans les mesures colorimétriques; Application à l'évaluation de la bilirubine dans le sérum sanguin. — Paris, Imp. R. Foulon, 1942, in-8°, 76 p., 15 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1942, N°)

SIMONOT (Yvonne). — Influence de la turbidité dans les mesures colorimétriques; Application à l'évaluation de la bilirubine dans le sérum sanguin. — Paris, Imp. R. Foulon, 1942, in-8°, 76 p., 15 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1942, N°)

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1942

THESE

N°

POUR
LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

Yvonne SIMONOT

Née le 17 juin 1913, à Paris.

Présentée et soutenue publiquement le 19 ..

INFLUENCE DE LA TURBIDITÉ
DANS LES MESURES COLORIMÉTRIQUES

Application à l'évaluation
de la bilirubine dans le sérum sanguin

TRAVAIL DE LA CLINIQUE MÉDICALE DE L'HOTEL-DIEU
(Service du Professeur Noël FIESSINGER)

Président : M. FIESSINGER, Professeur.

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, Rue Deparcieux, 29
1942



I. — PROFESSEURS

LE DOYEN BAUDOUIN

MM.

Anatomie	ROUVIERE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	GASTINEL.
Parasitologie et histoire naturelle médicale ..	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	N...
Pathologie chirurgicale	QUENU.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	AUBERTIN.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	DUVOIR.
Histoire de la médecine et de la chirurgie ..	
Pathologie expérimentale comparée	Henri BENARD.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
	ABRAMI.
	FIESSINGER.
	HARVIER.
Clinique médicale	P.-VALLERY-RADOT.
	CATHALA.
	Robert DEBRE.
Hygiène et clinique de la première enfance ..	
Clinique des maladies des enfants	LAINDEL-LAVASTINE
Clinique des maladies mentales et des maladies	GOUGEROT.
de l'encéphale	GUILLAIN.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	LEMIERRE.
Clinique des maladies du système nerveux	CADENAT.
Cliniques des maladies infectieuses	GOSSET.
	LENORMANT.
Clinique chirurgicale	MONDOR.
	VELTER.
Clinique ophtalmologique	CHEVASSU.
Clinique urologique	COUVELAIRE.
	LEVY-SOLAL.
Clinique d'accouchements	PORTES.
	MOCQUOT.
Clinique gynécologique	LEVEUF.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie ..	LOEPER.
Clinique thérapeutique médicale	LEMAITRE.
Clinique oto-rhino-laryngologique	BROCC.
Clinique thérapeutique chirurgicale	M. VILLARET.
Clinique propédeutique	TROISIER.
Clinique de la Tuberculose	MATHIEU.
Clinique chirurgicale orthopédique	DONZELOT.
Clinique de cardiologie	Clovis VINCENT.
Clinique de neuro-chirurgie	N...
Assistance Médico-sociale	DOGNON.
	GIROUD.
Professeurs sans chaire	HAZARD.
	JAYLE.
	JOANNON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGREGES EN EXERCICE

MM.			MM.		
AMELINE	Pathologie	chirurgicale.	HAGUENAU	Pathologie	médicale.
BARIETY	Pathologie	médicale.	LACOMME	Obstétrique.	
BERNARD Etienne.	Pathologie	médicale.	LANTUEJOUL	Obstétrique.	
BESANÇON Justin.	Hydrologie.		LAVIER	Parasitologie.	
BONNET	Bactériologie		LELONG	Pathologie	médicale.
BOULIN	Pathologie	médicale.	LEMAIRE	Pathologie	expérimentale.
BROUET	Pathologie	médicale.	LENEGRE	Pathologie	médicale.
BULLIARD	Histologie.		Mlle J. LEVY	Pharmacologie.	
CACHERA	Pathologie	médicale.	MARCHAL	Pathologie	médicale.
CORDIER	Anatomie.		MENEGAUX	Pathologie	chirurgicale.
COSTE	Pathologie	médicale.	MOLLARET	Pathologie	médicale.
JOUELAIRE (Roger)	Urologie.		MOUQUIN	Pathologie	médicale.
DELARUE	Anatomie	pathologique.	PATEL	Pathologie	chirurgicale.
DELAY	Pathologie	médicale.	PETIT-DUTAILLIS	Pathologie	chirurgicale.
DESGREZ (H.)	Physique.		RENARD	Ophtalmologie.	
DESOILLE	Médecine légale.		RICHET	Physiologie.	
DIGONNET	Obstétrique.		SENEQUE	Pathologie	chirurgicale.
DOGNON	Physique.		SICARD	Pathologie	chirurgicale.
FEVRE	Pathologie	chirurgicale.	SOULIE	Pathologie	médicale.
FUNCK-BRENTANO	Pathologie	chirurgicale.	SUREAU	Obstétrique.	
GALLIARD	Parasitologie.		TURPIN	Pathologie	médicale.
GARCIN	Pathologie	médicale.	WILMOTH	Pathologie	chirurgicale.
Mlle GAUTHIER-	Anatomie	pathologique.			
VILLARS	Pathologie	médicale.			
DE GENNES	Pathologie	médicale.			

III. — AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.			MM.		
ALGLAVE	Pathologie	chirurgicale.	HUGUENIN	Anatomie	Pathologique.
CHAILLEY-BERT ..	Physiologie.		LE LORIER	Obstétrique.	
GUENIOT	Obstétrique.		NEVEU-LEMAIRE	Parasitologie.	
HEITZ-BOYER	Pathologie	chirurgicale.	PIEDELIEVRE ...	Médecine légale.	
			VAUDESCAL	Obstétrique.	

IV. — AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ALAJOUANINE	} Clinique médicale.	BASSET	} Clinique chirurgi- cale.
BRULE		GATELLIER ...	
CHABROL		de GAUDART	
CHEVALLIER .		d'ALLAINES .	
LAROCHE Guy		MOULONGUET .	
LIAN		MOURE	
MOREAU			
SEZARY			

MM.	
ECALLE	} Clinique obstétricale
VIGNES	

V. — CHARGES DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
DECHAUME	Stomatologie.
N... ..	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans des dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MEMOIRE DE MON PERE
LE DOCTEUR GEORGES SIMONOT

A MA MERE

A MA GRAND-MERE

A MA SŒUR, A MON FRERE

A MADEMOISELLE JEANNE SAGOLS
Professeur Agrégée de Physique

A TOUS LES MIENS ET A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR NOEL FIESSINGER

Professeur de Pathologie expérimentale et comparée

Médecin des Hôpitaux

Officier de la Légion d'Honneur

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et qui nous a fait le grand honneur d'en accepter la présidence.

A NOTRE MAITRE
MONSIEUR LE DOCTEUR ANDRE DOGNON
Professeur de Physique Médicale

*Qui nous a accueillie
avec tant de bienveillance
dans son laboratoire et
nous a constamment aidée
dans notre tâche.*

A MES MAITRES
DES HOPITAUX ET DE LA FACULTE

A MES MAITRES DE LA SORBONNE

INFLUENCE DE LA TURBIDITE DANS LES MESURES COLORIMETRIQUES (visuelles et photovoltaïques)

Les techniques colorimétriques ont acquis dans ces dernières années un très grand développement. En effet, elles permettent d'effectuer rapidement et facilement le dosage de très petites quantités de substance. Il semble cependant que certaines causes d'erreur ou difficultés de ces techniques aient été insuffisamment aperçues (1).

Le but de ce travail est de mettre en lumière certaines d'entre elles, spécialement importantes pour les biologistes et les médecins, d'en chercher le remède et aussi d'accroître la précision des méthodes, comme d'en élargir le champ d'application. Nous essayerons ensuite d'appliquer ces données à certaines mesures relatives au sérum sanguin et notamment au problème de la bilirubinémie.

Il faut d'abord établir dans les méthodes une distinction de termes souvent négligée. La « Colorimétrie » est, strictement parlant, la mesure de la couleur.

Elle n'embrasse donc que les méthodes utilisant l'examen *visuel* en lumière *blanche* (ou au moins complexe) de liquides colorés. Les méthodes, bien plus usitées aujourd'hui, qui se proposent de déterminer l'absorption optique de milieux quelconques, soit en lumière monochromatique, soit à l'aide de récepteurs autres que l'œil, comme les cellules photoélectriques, sont des méthodes *photométriques* qui, dans ce cas particulier, peuvent être dites *absorptiométriques*. Cette distinction n'est pas seulement formelle. Lorsqu'on passe de l'un à l'autre groupe de méthodes, on constate parfois de très grandes différences dans les résultats. Elles tiennent à ce que l'œil, bon instrument pour la comparaison des couleurs, reste très au-dessous de la cellule photoélectrique par exemple, pour la détermination des différences de flux. L'absorptiométrie photoélectrique donne donc souvent des résultats imprévisibles par l'observation visuelle ou en désaccord apparent avec celle-ci. Nous en verrons plus loin des exemples.

BASES DE LA COLORIMETRIE.

Nous supposons connus les dispositifs colorimétriques usuels, du type Dubosq par exemple, et nous ne ferons que rappeler la base théorique de son fonctionnement qui est la loi de BEER-LAMBERT.

Si deux solutions ne diffèrent entre elles que par leur concentration en colorant, les épaisseurs respec-

tives x de solution que doit traverser la lumière pour que les faisceaux émergents aient la même intensité sont entre elles comme les inverses des concentrations

c . Soit $\frac{x'}{x} = \frac{c}{c'}$ ou $cx = c'x'$. On détermine tout de

suite la concentration cherchée c' en lisant la hauteur x' de solution qu'on doit interposer pour avoir la même intensité lumineuse qu'avec la solution étalon examinée sous une épaisseur donnée : il suffit de remplacer les lettres par leur valeur.

L'usage correct de l'appareil exige donc l'application rigoureuse de la loi de Beer ; nous verrons tout à l'heure ce qu'il faut en penser.

ABSORPTIOMETRIE VISUELLE.

L'inconvénient de la colorimétrie (en dehors de sa médiocre sensibilité) est de nécessiter un étalon constitué par une solution connue de la substance à doser ou, à la rigueur, d'une solution ou d'un écran présentant *exactement* la même teinte. Cette difficulté est levée si le colorimètre est éclairé en lumière monochromatique (radiation filtrée d'une lampe à mercure). (2). Dès lors le colorimètre devient un *absorptiomètre*. La notion de couleur est exclue, n'importe quel système absorbant peut être comparé à n'importe quelle solution colorée et peut servir à repérer une concentration déterminée sous une épaisseur déterminée.

Supposons qu'une solution à N_g pour 1000 donne sous une épaisseur de 1 cm. l'égalité des plages avec un absorbant quelconque (écran coloré ou gris neutre, grille, etc...) placé sous l'autre cuve de l'appareil et que nous trouvions que, avec une autre solution de même nature, l'épaisseur nécessaire soit de 2 cm., l'application de la loi de Beer nous indique que cette solution est de concentration $n/2$.

Le « Stufenphotometer » de ZEISS fonctionne sur ce principe avec cette différence que l'éclairement de l'une des plages est réglé par un diaphragme œil de chat et que la lumière convenable est sélectionnée par des filtres colorés. L'insuffisance du monochromatisme ainsi obtenu donne lieu, dans certains cas, à de graves difficultés d'emploi par le fait que la notion de couleur n'étant pas tout à fait exclue, il subsiste une petite différence de teinte gênante entre la plage éclairée par la lumière qui a traversé la solution et celle qui reçoit la lumière ayant seulement traversé l'œil de chat.

Ces méthodes constituent en quelque sorte une spectrophotométrie simplifiée. Nous reviendrons plus loin sur les méthodes de spectrophotométrie véritable.

ABSORPTIOMETRE PHOTOELECTRIQUE. (3)

Dans ces dispositifs de plus en plus employés, le récepteur est soit une cellule photoélectrique propre-

ment dite soit une cellule à couche d'arrêt c'est-à-dire capable de transformer l'énergie lumineuse en courant électrique sans le secours d'une différence de potentiel accélératrice. Nous n'exposerons pas le fonctionnement de ces cellules et le détail des nombreux montages que l'on peut réaliser; nous décrirons plus loin celui que nous avons utilisé, nous proposant de rester, dans ce chapitre, dans des considérations très générales.

Soit une cellule qui reçoit le flux lumineux I' émané d'une source constante S . Elle donne de ce fait un courant i_0 indiqué par le galvanomètre G . Interposons sur le faisceau une cuve C contenant le liquide

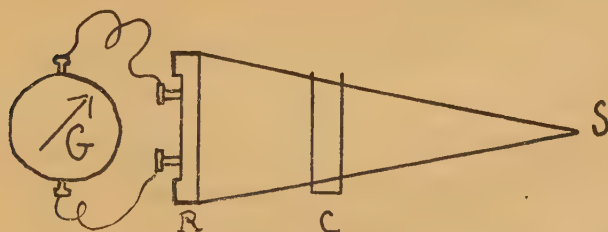


Figure 1

absorbant. Le flux reçu devient I et le courant correspondant i . Dans certaines conditions (faibles flux, faibles résistances de l'appareil de mesure) on peut poser :

$$\frac{I}{I_0} = \frac{i}{i_0}, \text{ mais il est beaucoup plus correct d'opé-}$$

rer par méthode de substitution, en remplaçant la cuve C par un système d'absorption réglable, tel qu'un coin photométrique, un disque tournant à secteur variable, etc..., dont on fait varier la valeur jusqu'à obtenir le même courant i. Si la source est restée constante, nous sommes en droit de dire que l'absorption (connue) du système interposé est égale à celle de la cuve.

On caractérise généralement l'absorption par la *Densité optique*.

$$D = \log \frac{I_0}{I}$$

Ainsi pour le système qui transmet 10 % de la lumière c'est-à-dire absorbe 90 %, $\frac{I_0}{I} = 10$ et $D = 1$.

Il est facile de voir que la densité optique d'une solution est *proportionnelle* à sa *concentration* et aussi à son *épaisseur*. Par conséquent, si on a, une fois, déterminé la densité optique d'une solution de concentration connue, il suffira, en théorie, de mesurer la densité optique de la solution étudiée pour que sa concentration soit déterminée.

L'application non discutée de cette règle théorique peut conduire à d'importantes erreurs que nous croyons utile de signaler. En effet, elle suppose que l'on ait bien la relation :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-Kcx}$$

et par conséquent :

1°) Que la loi de Beer soit bien vérifiée (constance du produit $c \times x$)

2°) que, ceci étant réalisé, le coefficient d'absorption K de la substance considérée soit constant.

Nous examinerons ces deux points importants :

1°) *Il faut que la loi de Beer soit vérifiée.*

La vérification de la loi de Beer repose sur la proportionnalité des densités optiques aux concentrations ou aux épaisseurs; la courbe représentant les densités optiques en fonction des concentrations ou des épaisseurs est une droite, en radiations monochromatiques. L'application de cette loi est, dans un très grand nombre de cas, inexacte et on a trop tendance à l'appliquer sans discussion.

Les causes d'erreur sont d'importance variable avec le procédé de mesure du flux lumineux, visuel ou photoélectrique, et suivant le principe de mesure de flux lumineux.

La loi de Beer peut ne pas s'appliquer, c'est-à-dire que le produit cx peut ne pas être constant. Il peut ne pas l'être par suite de phénomènes de dissociation électrolytique; lorsque les molécules et les ions sont de couleurs différentes, la couleur de la solution varie comme la dissociation, avec la dilution; il peut en être de même du degré de polymérisation.

2°) *Constance de K.*

Mais même si la loi de Beer s'applique, il suffit que la radiation ne soit pas monochromatique pour que, en toute rigueur, il soit généralement impossible de la vérifier. La densité optique cesse d'être proportionnelle à l'épaisseur ou à la concentration par suite de la modification du coefficient d'absorption moyen de la lumière dans l'absorbant coloré ce qui constitue « l'effet de filtre ».

EFFET DE FILTRE.

Supposons que la lumière incidente soit blanche et le système absorbant coloré. La lumière émergente sera elle-même colorée puisque le milieu transmet au maximum certaines radiations ce qui lui confère précisément son caractère coloré. Par conséquent il est facile de comprendre que l'absorption, relativement importante dans les premières couches traversées, le sera moins dans les dernières. Cet effet est naturellement d'autant plus marqué que l'épaisseur ou la concentration du colorant est plus grande. La densité optique ne peut donc être proportionnelle à ces deux grandeurs et la droite théorique se transforme en une courbe à concavité inférieure. Seules des solutions infiniment diluées ou examinées en couche très mince peuvent pratiquement donner la droite théorique.

Il faut remarquer que l'adjonction de filtres sélec-

tifs sur le trajet du faisceau lumineux est souvent insuffisante pour apporter le monochromatisme nécessaire. En effet si cela est assez facile du côté rouge du spectre, c'est presque impossible du côté bleu c'est-à-dire dans les conditions convenables pour l'étude des solutions jaunes. Ceci résulte du fait que, d'une part, les filtres rouges peuvent être très sélectifs, que l'émission des lampes à incandescence utilisées dans la plupart des appareils est très grande dans cette région et qu'enfin les cellules à couche d'arrêt généralement employées dans les absorptiomètres photoélectriques sont aussi très sensibles dans cette région. Par contre on ne possède pas de filtres bleus réellement sélectifs; d'autre part la faible sensibilité des cellules et la faible émission des lampes dans le bleu font que le rayonnement réellement efficace est dans ce cas extrêmement loin du monochromatisme. De plus, une très légère modification spectrale de la lumière transmise peut être suffisante, en raison de la courbe spectrale de sensibilité des cellules aussi bien que de l'émission de la lampe, pour modifier beaucoup la réponse de l'appareil.

L'incurvation parfois considérable des courbes $D = f(c)$ dont on verra des exemples par la suite en ce qui concerne le sérum sanguin, enlève toute précision à la détermination de la concentration en colorant. En effet une très forte variation de celle-ci se traduit si les solutions sont concentrées par une varia-

tion insignifiante de l'absorption ou de la densité optique. Par ailleurs, l'emploi de solutions très diluées ou en couches très minces diminue évidemment aussi la précision. Il y a donc une zone de dilution ou d'épaisseur utilisable qui correspond à des conditions de précision acceptable et qui dans certains cas (sérum) n'est pas très étendue.

INFLUENCE DES PHENOMENES DE DIFFUSION (4) (5)

Dans ce qui précède nous avons envisagé une absorption globale sans chercher dans le détail ce qu'elle signifiait. Cette absorption globale peut en réalité ressortir à deux phénomènes différents : d'une part, ce que nous appelons *absorption vraie* ou de *couleur* qui correspond à une transformation de l'énergie lumineuse; en second lieu, *l'absorption de diffusion* qui n'est qu'une absorption apparente.

Cette absorption de diffusion se rencontrera non seulement dans les milieux troubles proprement dits mais encore dans tous les cas où nous sommes en présence de solutions colloïdales, soit que le colorant soit lui-même sous cette forme colloïdale (hémoglobine, chlorophylle, etc...) soit que des particules non centrifugeables se trouvent dans le solvant en même temps que le colorant. On conçoit que ces cas soient, à priori, très importants dans la colorimétrie des systèmes biologiques.

De la superposition de cet effet de diffusion à l'absorption vraie, a pu naître une erreur d'autant plus importante et facile à commettre que l'œil est incapable d'en apprécier l'importance et même souvent d'en déceler l'existence. L'œil en effet estime surtout des teintes tandis que les absorptiomètres usuels, pour des raisons de facilité de construction, sont généralement disposés de façon à révéler au maximum la diffusion, d'où une discordance parfois très manifeste entre les résultats de l'observation grossière de la couleur et de la mesure absorptiométrique. Nous en donnerons tout à l'heure des exemples. Ceci nécessite que nous disposions d'un absorptiomètre dans lequel soit prévu un dispositif permettant, sinon la mesure absolue de la diffusion, du moins l'appréciation de l'ordre de grandeur des erreurs qui peuvent en résulter.

DIFFUSO-ABSORPTIOMETRE DU PROFESSEUR DOGNON. (3)

Le diffusio-absorptiomètre du Professeur DOGNON répond à ces desiderata (fig. 2).

On utilise deux faisceaux diamétralement opposés issus d'une source constituée par une lampe de 6 v. 6 A.

Le faisceau dirigé vers P_2 traverse un écran anticalorique (qu'on peut remplacer par un filtre coloré), une fente munie d'un écran dépoli D muni lui-même d'un diaphragme iris et arrive sur la cellule photo-électrique P_2 .

Le faisceau dirigé vers P_1 est collimaté par le condensateur L , traverse un écran anticalorique (ou un filtre coloré), un diaphragme circulaire de 7 mm. de diamètre devant lequel on peut amener l'une quelconque des cinq grilles dont on connaît la densité optique; le faisceau traverse ensuite la cuve C contenant le liquide à examiner et arrive sur un diaphragme fixe muni d'un écran dépoli puis sur la cellule P_1 . Le rôle de cet écran dépoli est de répartir le faisceau de rayons sur une grande surface, ce qui évite l'échauffement et la fatigue des cellules et, de plus, une erreur possible due à la non homogénéité de la surface sensible.

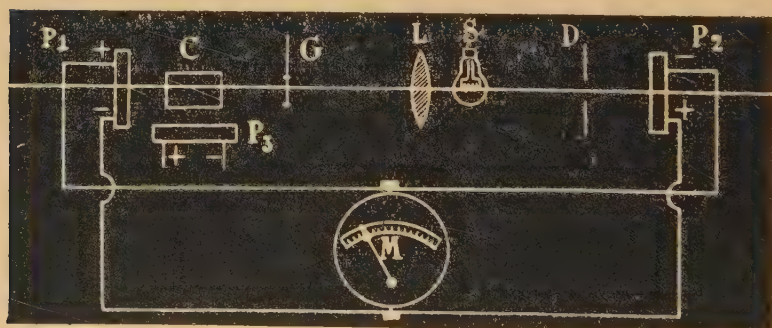


Figure 2

Les deux cellules P_1 et P_2 sont montées en opposition sur un microampéremètre donnant 15 microampères pour la déviation totale (150 divisions).

Les rhéostats R et R' permettent de faire varier avec précision l'éclat du filament alimenté soit par

une batterie d'accumulateurs de 6.8 volts, soit par un stabilisateur de courant approprié.

FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL...

On peut se proposer soit de mesurer l'absorption d'une solution limpide ou trouble, soit de mesurer sa diffusion.

MESURE DE L'ABSORPTION.

1°) On règle le microampéremètre au zéro en agissant par l'intermédiaire du diaphragme iris sur le faisceau de droite, avec la cuve pleine du solvant de la solution colorée étudiée placée en avant de la cellule P_1 .

2°) On introduit alors sur le trajet du faisceau lumineux de gauche l'une des grilles étalon, soit par exemple la grille n° 1 qui donne une absorption de 20 %. L'équilibre étant rompu on amène l'aiguille du microampéremètre à une division que l'on choisit, 40 par exemple, en agissant au moyen du rhéostat sur l'éclat du filament.

3°) Si l'on supprime la grille étalon et que l'on remplace d'autre part le solvant par la solution colorée à étudier, la déviation observée mesure l'absorption due à la couleur de notre solution. Les déviations n'étant pas exactement proportionnelles aux absorptions on a dressé des courbes des absorptions en fonction des déviations de l'appareil pour chacune des gril-

les et, pour chaque grille, pour les différentes sensibilités; en effet suivant la sensibilité désirée on règle la grille 1 à la division 10 — 20 — 40 — ou 80. On a naturellement une sensibilité deux fois plus grande en réglant sur 80 qu'en réglant sur 40. L'accroissement de sensibilité est obtenu aux dépens de la stabilité du réglage mais celle-ci peut pourtant être réalisé de manière satisfaisante.

Connaissant la déviation il suffit, pour connaître la concentration cherchée, de se reporter à la courbe d'étalonnage de la substance donnant les concentrations en fonction des déviations.

MESURE DE LA DIFFUSION (5)

Mise en évidence de la diffusion.

Prenons une solution que nous considérons d'abord comme purement diffusante. Une particularité essentielle du diffusio-absorptiomètre est qu'il a été prévu deux positions différentes pour la cuve; la cuve en effet peut-être placée presque au contact du récepteur R (fig. 3) (ou P₁ de la fig. 2) dont elle n'est séparée que par un diaphragme et un écran diffusant, nous l'appellerons position rapprochée ou position (1); elle peut être aussi placée en (2) à 6 cm. environ du récepteur, c'est la position éloignée.

On voit clairement sur la figure que la lumière diffusée est reçue sous un angle solide plus grand lors-

que la cuve est placée en (1) que lorsqu'elle est placée en (2). Cet angle serait égal à 2π stéradians si la cuve était d'épaisseur négligeable et au contact même du récepteur; il est très petit lorsque la cuve est en (2) car le faisceau lumineux est très étroit (il n'a que 7 mm. de section). Ceci explique que l'on trouve une densité optique plus petite en (1) qu'en (2). La variation de la densité optique dans ces conditions déterminées mesure la turbidité du milieu et permet d'apprécier l'erreur commise sur la mesure colorimétrique effectuée en position (1).

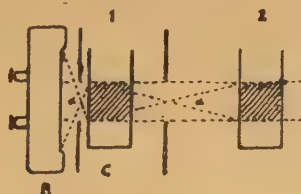


Figure 3

Dans toute mesure colorimétrique on devra s'inquiéter de mesurer la turbidité, le seul cas où l'on pourrait n'en pas tenir compte étant celui où le changement de position de la cuve n'amènerait pas un changement de la densité optique plus grand pour la solution que pour le solvant seul. Or la turbidité varie beaucoup avec de nombreux facteurs et il est très rare d'arriver à des solutions de turbidité équivalente lorsqu'on fait subir des manipulations en apparence iden-

tiques à des milieux biologiques tels que des sérums sanguins par exemple.

Les erreurs qui peuvent être commises sur les concentrations sont donc parfois considérables surtout lorsque la cuve est placée loin du récepteur et que les faisceaux utilisés ont une petite ouverture ce qui est encore le cas le plus fréquent.

Remarquons que, dans toutes les mesures spectrophotométriques usuelles, la cuve est placée devant la fente du spectroscope et loin du récepteur; il en résulte que dans certains cas les densités optiques trouvées sont beaucoup trop élevées et peuvent n'avoir pas de rapport avec la densité de couleur. Ainsi HEILMEYER donne pour l'hémoglobine une courbe spectrophotométrique qui reste au-dessous de celle de l'oxyhémoglobine, même dans le rouge, région spectrale où l'absorption vraie devient faible; l'absorption vraie de l'hémoglobine est supérieure et non inférieure à celle de l'oxyhémoglobine mais les solutions d'oxyhémoglobine peuvent être fortement diffusantes, d'ailleurs à des degrés divers, variant avec le pH et la concentration saline. Il semble donc bien que les résultats contradictoires donnés par HEILMEYER soient dus à l'intervention de la diffusion.

MESURE DE L'INDICE DE DIFFUSION.

Il résulte de ce que nous avons dit plus haut que l'on peut déterminer un « indice de diffusion ». En

effet la densité de couleur est évidemment la même quelle que soit la position de la cuve; seule la grandeur de l'angle sous lequel le flux diffusé arrive à la cellule change et par conséquent seule change aussi l'intensité de la lumière diffusée.

Nous pourrons donc, après avoir mesuré l'absorption globale d'un système coloré diffusant en position (1) compenser l'absorption de couleur en ramenant l'aiguille du microampermètre au zéro et en réglant de nouveau la sensibilité comme il a été dit précédemment; la valeur que nous trouverons en position (2) mesure *exclusivement* la turbidité.

Cette valeur que nous appelons « indice de diffusion », rapportée à la courbe d'étalonnage du colorant examiné, met en évidence l'erreur commise, le nombre de milligrammes de bilirubine en excès, par exemple, trouvés du fait du passage de la position (1) à la position (2).

Cet indice permet aussi de comparer la turbidité de milieux diversement colorés comme des suspensions de bactéries, sans que la couleur apporte un obstacle quelconque.

Le tableau suivant montre l'ordre de grandeur des différences de densité optique obtenues dans les deux positions de la cuve précédemment définies, et aussi l'incohérence des résultats obtenus s'ils ne sont pas

discutés et corrigés en tenant compte de l'indice de diffusion.

Tableau I

Absorptions procentuelles de sérums et plasmas sanguins
Filtre laissant passer le vert et le bleu. Cuve de 1 cm.

	Absorption en position rapprochée (1)	Absorption en position éloignée (2)	Indice de diffusion
Eau	0	1,5	1,5
Sérum n° 1 jaune limpide	42,5	46,5	6
Sérum n° 2 normal limpide	43	51	13
Sérum n° 3 jaune à peine louche	47	58,5	24,5
Sérum n° 4 pâle à peine louche	34,5	48,5	20

On s'étonne de trouver pour le sérum n° 2 un chiffre supérieur à celui du sérum n° 1 qui est plus jaune, la cause en est sa plus grande turbidité d'ailleurs invisible à l'œil.

On voit que les erreurs déjà grandes en position (1) le sont encore beaucoup plus en position (2).

Il est donc bien établi : 1°) que la densité optique d'un milieu est la somme de la densité de couleur et de la densité par effet de diffusion et 2°) que dans le cas des sérums et des plasmas sanguins la variabilité du degré de turbidité est extrême. En effet, nous venons de voir qu'il en est de limpides à l'examen visuel et qui le sont effectivement, c'est-à-dire que l'absorptiomètre n'y décèle pas de diffusion appréciable; il en

est d'autres au contraire que l'examen absorptiométrique révèle être diffusants; d'autres sont troubles sans que l'œil puisse apprécier le degré de cette turbidité; d'autres enfin présentent un trouble partiellement centrifugeable.

Cela montre les grandes difficultés de la colorimétrie du sérum et du plasma sanguin. Nous avons vu en effet que les bases de la colorimétrie reposent sur la comparaison des couleurs par l'examen visuel ou des absorptions de couleur en absorptiométrie, de deux solutions identiques à tous points de vue sauf en ce qui concerne leur concentration en colorant; c'est-à-dire que le solvant doit être le même. Or ce qui précède met en évidence que deux sérums ou deux plasmas diffèrent optiquement par bien d'autres choses que la concentration du colorant; ils n'ont jamais la même composition chimique et les variations de la lipémie en particulier entraînent des variations du degré de turbidité. De plus le sérum et le plasma contiennent d'autres colorants que ceux dont on cherche à évaluer la concentration.

Il en résulte qu'il faudra d'une part prendre des précautions pour éliminer autant que possible les causes d'erreur et d'autre part discuter les résultats obtenus.

Dosage de la bilirubine. — Pour doser correctement la bilirubine dans le sérum sanguin, il faudrait

que l'indice de diffusion du sérum envisagé fût le même que celui du sérum qui a servi à l'étalonnage de l'appareil, mais ceci ne se réalisant que rarement, le mieux sera de faire l'étalonnage avec un sérum peu diffusant et de tenir compte ensuite de l'absorption de diffusion du sérum envisagé.

Dosage du Rose Bengale. — Examinons maintenant la technique de l'épreuve du Rose Bengale et voyons si l'on peut espérer obtenir des résultats corrects par absorptiométrie :

On prélève 10 cc. de sang que l'on recueille sur 2 cc. d'oxalate de potassium à 2 %, on injecte immédiatement 1,5 mg. par kilogramme de poids, soit pour 60 kg. : 4 cc. 5 d'une solution à 20 mg. par cc. de Rose Bengale, enfin, 45 minutes après cette injection, on prélève à nouveau 10 cc. de sang sur 2 cc. d'oxalate.

On centrifuge les deux tubes de sang et l'on compare colorimétriquement les plasmas. Dans ce cas, on croyait pouvoir espérer être dans de bonnes conditions puisque dans les deux tubes le sérum est celui du même malade et on pensait : 1°) Que la couleur rose du 2^e tube était celle du Rose Bengale non encore éliminé au bout de 45 minutes et 2°) que de l'intensité de cette couleur rose on pouvait déduire le taux de Rose Bengale. En absorptiométrie, on devait trouver une densité optique plus grande dans le 2^e cas que dans le 1^{er}, le supplément mesurant la densité de cou-

leur du Rose Bengale; or, il n'en est rien, comme l'a bien montré pour la première fois le Professeur Noël FIESSINGER. Nous avons observé bien des cas de cette espèce dans lesquels le 2° plasma était soit plus trouble soit moins trouble que le premier ainsi qu'on s'en assure par la mesure de l'indice de diffusion. On peut penser que ce trouble est attribuable à la lipémie qui peut varier de façon notable sous des influences minimes, comme la première prise de sang par exemple.

Lorsque l'on recherche de faibles quantités de Rose Bengale, les variations de turbidité entraînent des variations de densité optique souvent supérieures à celle de la couleur que l'on cherche.

Les mêmes remarques sont évidemment valables en ce qui concerne tous les dosages colorimétriques sur le plasma et par exemple, ceux qui utilisent le Rouge Congo ou d'autres colorants analogues pour la mesure de la masse totale du sang.

METHODES DE CORRECTION DE L'ERREUR DUE A LA DIFFUSION.

Pour réduire l'erreur de diffusion au minimum avec notre dispositif nous avons vu qu'il faudrait appliquer la cuve contre le récepteur mais que dans ces conditions l'angle solide sous lequel est reçu le flux diffusé est inférieur à 2π stéradians. Or il n'est pas facile d'en déduire la grandeur de la totalité du flux dif-

fusé car celle-ci dépend de la forme de l'indicatrice de diffusion, c'est-à-dire de la répartition de la lumière diffusée autour du système diffusant :

1°) Si c'est une sphère, c'est-à-dire si les surfaces d'égale intensité du flux diffusé sont des surfaces sphériques comme cela peut-être à peu près le cas pour les particules colloïdales non éliminables par centrifugation, on pourra corriger par le calcul le résultat trouvé pour l'absorption en position rapprochée [position (1)], en lui retranchant la différence entre l'absorption globale trouvée dans les deux positions.

2°) Mais l'indicatrice de diffusion est loin d'être toujours sphérique et, pour un même milieu, elle varie avec le temps. En général elle est très allongée vers l'avant, de sorte que le récepteur reçoit la presque totalité du flux diffusé par la cuve placée en position rapprochée et que, par conséquent, la mesure faite dans ces conditions est à peu près correcte puisqu'elle s'adresse presque uniquement à l'absorption de couleur. C'est le cas d'une suspension diluée de particules de quelques microns.

CORRECTION PAR LE DIAPHRAGME.

On peut imaginer un dispositif empirique correcteur de la diffusion en se basant sur ce qui suit : en interposant un écran circulaire E entre la cuve et le récepteur aucune lumière n'arrive au récepteur si

l'écran a le même diamètre que le faisceau lumineux, dans le cas d'un liquide limpide. Au contraire l'écran recevra de la lumière diffusée si le milieu est trouble. C'est ce que montre bien la figure 4. Le liquide semble donc alors être doué d'une absorption négative.

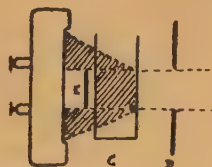


Figure 4

On comprend que l'on puisse arriver à annuler exactement l'absorption de diffusion en réglant les dimensions relatives de l'écran et du diaphragme. Mais, du fait de l'intervention de la forme de l'indicatrice de diffusion qui est une manifestation de la structure intime du milieu diffusant, il faudrait faire un réglage avec une solution absolument identique mais décolorée et régler le diaphragme jusqu'à annuler l'absorption apparente; substituant alors la solution colorée à celle-ci, l'absorption notée ne serait due qu'à la diminution du flux émergent transmis par absorption de couleur.

La figure 5 montre bien l'intérêt du correcteur dans la mesure de la concentration de trois types de suspensions non colorées : gélatine, résine et cholestérol, différemment concentrées.

Lorsqu'on fait croître la concentration des trois types de suspensions examinées (gélatine, résine, cholestérol) on voit que par le dispositif usuel, l'absorption prend rapidement des valeurs considérables et atteint respectivement des valeurs de 17, 27 et 24 % pour les

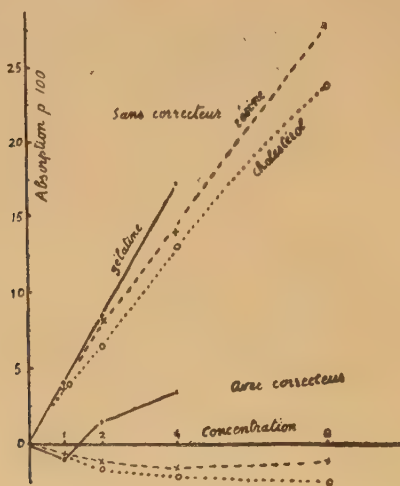


Figure 5

plus concentrées des trois suspensions examinées. Cette absorption est due à la diffusion pure et correspondrait par conséquent à une erreur dans le cas d'une mesure colorimétrique. Par contre, avec le dispositif correcteur, les courbes s'écartent peu de l'axe des abscisses. L'absorption est réduite à des valeurs comprises entre 2 et 5 % (par surcorrection dans le cas de la résine et du cholestérol, par sous-correction dans le cas de la gélatine). Notons que l'erreur sans correc-

teur est doublée si l'on opère en position éloignée; ce fait est très important puisque c'est encore dans ces conditions que l'on opère couramment.

COMPARATEUR COLORIMETRIQUE
A SPHERE D'INTEGRATION
DU PROFESSEUR DOGNON (FIGURE 6) (4)

Dans tous les cas où les particules en suspension sont très petites, la forme de l'indicatrice de diffusion est telle que le flux diffusé non reçu par le récepteur est considérable et on ne peut espérer faire de mesures correctes qu'en recueillant la lumière diffusée dans la totalité d'une sphère entourant le diffuseur.

Le liquide à examiner est versé dans une cuve en verre soufflé dont la capacité est 5 cc., le fond en est déprimé de façon à englober la source, petite lampe de 2 watts, fixée au centre de la sphère. La sphère qui a 15 cm. de diamètre est peinte intérieurement en blanc, on y a pratiqué 2 ouvertures diamétralement opposées où sont appliquées 2 cellules photoélectriques montées en parallèle.

Avec ce dispositif, tout rayon diffusé par le liquide finit, après un certain nombre de réflexions sur les parois, par impressionner les cellules, et comme le pouvoir réflecteur de la paroi est voisin de l'unité,

l'absorption d'un système incolore et diffusant est nulle.

Théoriquement, la sphère devrait être très grande par rapport au volume occupé par la cuve afin que les rayons diffusés par le liquide aient peu de chance de retraverser la cuve et d'être absorbés en partie de nouveau par le liquide coloré. Pratiquement on obtient

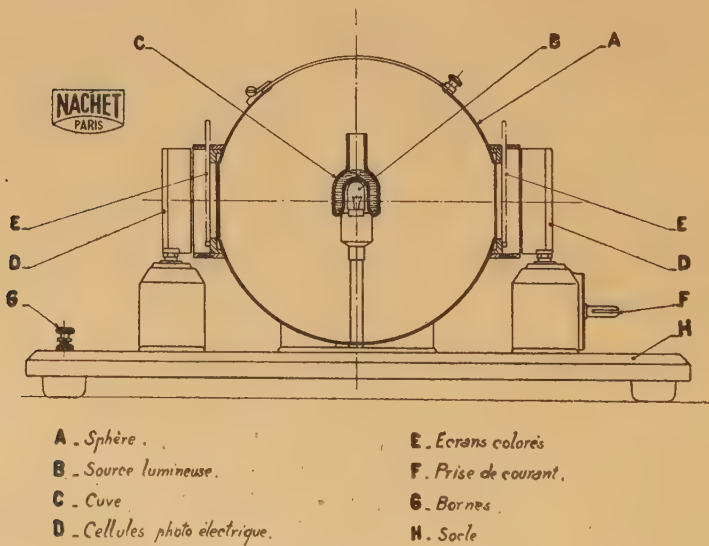


Figure 6

d'excellents résultats avec la sphère de 15 cm. de diamètre en prenant la précaution de vérifier que le plan du filament de la lampe coïncide avec celui qui contient le diamètre vertical des cellules; dans ces conditions on remédie à l'inégale répartition du flux lumineux.

L'échauffement est minime, il n'est que de 5° en 5 minutes au maximum et les mesures sont rapidement faites.

Avec ce dispositif l'absorption notée n'est due en définitive qu'à la diminution du flux émergent transmis par absorption de couleur avec transformation de l'énergie.

La cuve ne pouvant être parfaitement définie, l'appareil n'est qu'un comparateur colorimétrique; on se reportera toujours, pour évaluer une concentration, à une courbe d'étalonnage établie dans des conditions bien déterminées.

Avec le colorimètre intégrateur à sphère, un liquide incolore trouble se comporte comme un liquide limpide, l'absorption est nulle. Dans le cas d'un liquide coloré, l'influence de la turbidité est faible, elle ne devient appréciable que si le liquide est à la fois très coloré et trouble, ceci est dû à une augmentation de l'épaisseur efficace de la cuve. Mais pour étudier l'influence de la turbidité nous avons été amenée à examiner des solutions plus troubles que celles que l'on rencontre ordinairement en biologie.

L'utilisation du flux lumineux étant presque totale, on peut, malgré la faible puissance de la lampe (6 V — 0,3 A), obtenir avec des filtres très sélectifs des courants d'une dizaine de microampères.

EVALUATION NUMERIQUE DES ERREURS DE DIFFUSION
AVEC LES DIFFERENTS DISPOSITIFS PRECEDENTS.

Pour mettre en évidence les erreurs dûes à la diffusion et montrer ce que donnent les différentes méthodes de correction, nous avons préparé une série de tubes dans lesquels nous avons ajouté à un même volume de solution de bichromate de potassium, de l'eau et une suspension de résine de façon à avoir la même concentration en bichromate et des turbidités croissantes.

Il suffit de se reporter à la courbe d'étalonnage de solutions limpides de bichromate pour connaître la concentration qui correspond à la densité optique trouvée et par suite en déduire l'erreur commise puisqu'on connaît la concentration véritable (et fixe) en bichromate.

On a opéré dans tous les cas avec un écran vert laissant passer aussi le bleu

Concentration pour 1000 évaluée à partir de :

Solution	Absorption mesurée		Absorption corrigée	
	en position rapprochée	éloignée	Par différ. des dens. optiques	Par diaphragme correcteur
Limpide	0,35	0,35		0,36
Trouble n° 1 ..	0,53	0,69	0,41	0,33
Trouble n° 2 ..	0,69	0,99	0,49	0,35
Trouble n° 3 ..	1,05	2,7	0,59	0,31
Trouble n° 4 ..	3,6	11	1,20	0,33
Trouble n° 5 ..	20			0,88

Le colorimètre à sphère donne pour la cuve contenant 4 cc., une absorption de 8 % pour toutes les solutions quelle que soit la concentration en suspension de résine; elle est de 13,5 % également dans tous les cas pour une cuve plus grande contenant 9 cc. On ne commet donc plus aucune erreur sur la concentration.

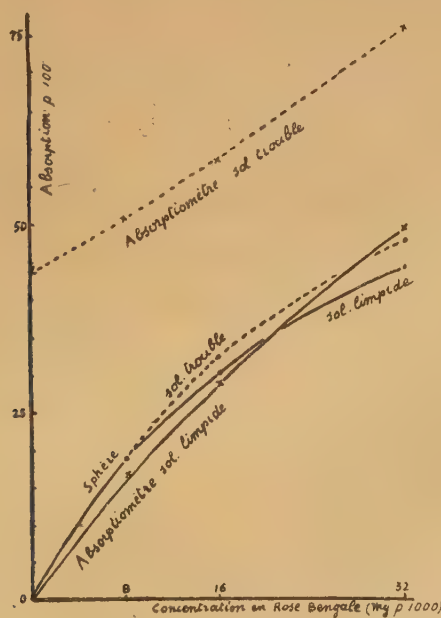


Figure 7

La figure 7 montre l'influence très grande de la turbidité dans les mesures de l'absorption de couleur faites au diffusio-absorptiomètre et l'intérêt qu'il y a à se servir du colorimètre intégrateur à sphère.

APPLICATION A L'EVALUATION DE LA BILIBURINE DANS LE SERUM

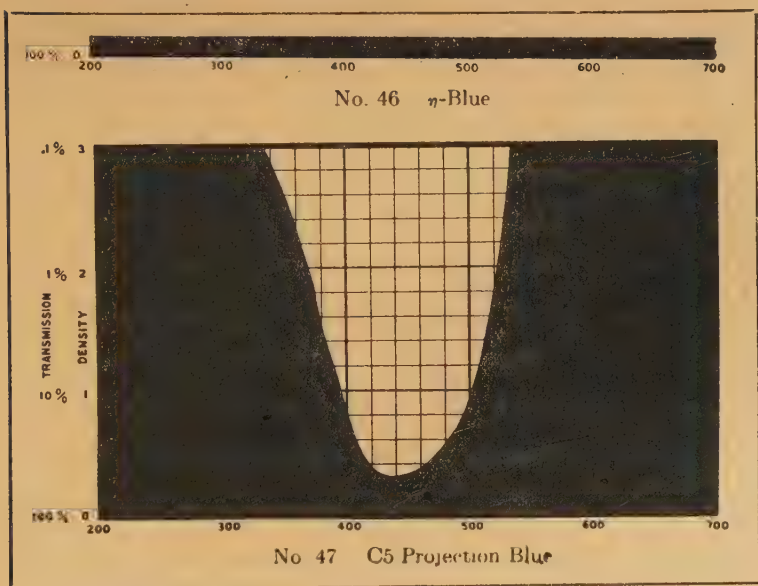
PRINCIPE DE LA MESURE PAR ADJONCTION DE BILIRUBINE.

Nous nous proposons de déterminer la teneur en biliburine d'un sérum sanguin par la voie colorimétrique.

Les expériences de nombreux auteurs, entre autres HEILMEYER (6) qui mesure la couleur du sérum à l'aide du photomètre de Pulfrich avec le filtre spectral 547, et les nôtres que nous rapporterons plus loin, nous autorisent à négliger sauf exception, dans un milieu hospitalier, l'influence du carotène et des lipochromes et à dire que l'absorption de couleur des différents sérums est fonction uniquement de leur concentration en bilirubine. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

Notre tâche était donc d'établir une courbe d'éta-lonnage des absorptions (ou des déviations de l'aiguille du microampéremètre ce qui revient au même) en fonction des concentrations en bilirubine, en prenant bien soin d'éliminer l'erreur due à la diffusion dont nous avons montré plus haut l'importance capitale. Il n'y a donc pas d'autre possibilité pour une semblable étude que dans l'emploi du comparateur colorimétrique à sphère d'intégration plus haut décrit. Le pro-

blème est de mesurer l'absorption de couleur d'un sérum avec la plus grande précision possible. En quelle lumière devons-nous faire nos mesures ? Le sérum sanguin nous apparaît jaune parce qu'il arrête presque électivement les radiations bleues c'est-à-dire que le coefficient d'absorption du sérum pour le bleu est très grand par rapport aux coefficients d'absorption pour les autres couleurs; il est évident que c'est en opérant avec un filtre bleu que nous atteindrons notre but, c'est pourquoi nous avons choisi l'écran Wratten dont la transmission est la suivante :



1) MESURE PAR COLORIMETRIE DIRECTE.

La courbe ci-contre n° 9 montre les résultats absolument indispensables et si par exemple on était gêné

par la trop petite quantité de lumière qui passe à travers un tel filtre on pourrait sans grand inconvénient employer un filtre vert avec lequel le coefficient d'absorption de la bilirubine a déjà une valeur suffisante mais, dans ce cas, certaines matières étrangères comme des traces d'hémoglobine pourraient avoir une importance plus considérable. D'autre part l'influence relative de la diffusion serait alors plus grande.

Pour établir cette courbe d'étalonnage nous avons opéré par adjonction à un sérum donné de quantités connues croissantes de bilirubine et nous avons tracé la courbe des absorptions (ou plus exactement des déviations ce qui revient au même) en fonction des quantités de bilirubine *ajoutées*. On voit que pour tracer la courbe définitive il faut connaître la concentration x du sérum initial. Cette concentration peut être théoriquement déterminée d'après la loi de variation; nous avons pensé pouvoir le faire par extrapolation de la courbe; celle-ci en effet coupe l'axe des ordonnées en un point qui représente l'absorption du sérum initial, la courbe extrapolée coupe l'axe des abscisses en un point dont l'abscisse changée de signe nous donne la concentration x du sérum initial que nous cherchons. Nous pouvons alors tracer la courbe définitive : il suffit de faire subir à chaque point de la courbe une translation dans le sens des abscisses croissantes et

égale à x . En effet l'absorption A_0 est celle du sérum initial, A_0 correspond à x mg

A_a correspond à $x + a$ mg

A_b correspond à $x + b$ mg, etc...

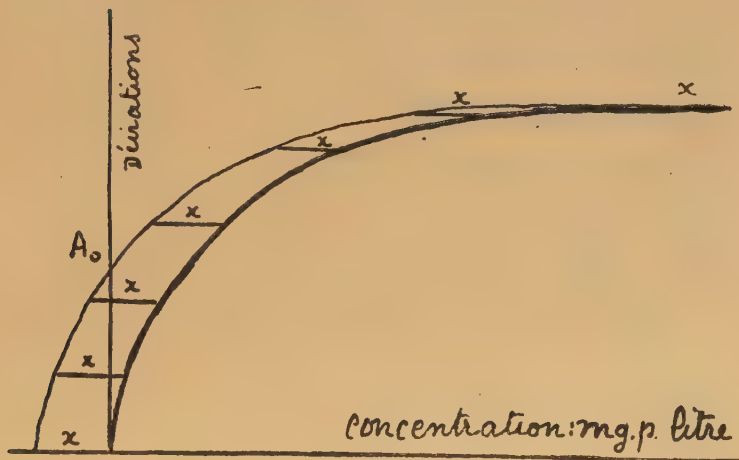


Figure 8

Voici comment nous avons opéré :

Nous avons ajouté la bilirubine sous forme d'une solution en poudre Merck dans la soude décinormale N

— Nous avons dissous 2 mg. 5 de cette bilirubine 10

dans 2 cc. 5 de la solution de soude et avec cette solution à 1000 mg. au litre nous avons préparé une solution mère à 200 mg. au litre; pour cela nous avons ajouté 2 cc. de la solution à 1000 mg. au litre, à 8 cc. de sérum.

A l'aide de cette solution mère, contenant 200 mg.

en plus des x mg qu'elle contenait déjà, nous avons préparé, par dilutions successives *au sérum*, des solutions contenant respectivement au litre :

100 mg. + x , 50 mg. + x , 25 mg. + x ,
12,5 mg. + x , 6,25 mg. + x et enfin x , c'est le sérum initial.



Figure 9

La condition précédemment énoncée n'est pas abus. L'extrapolation est facile et les divergences sur la valeur initiale ne portent que sur 1 ou 2 mg. de bilirubine au litre.

Mais cette courbe n'est utilisable comme courbe d'étalonnage que si sa forme générale reste identique quel que soit sérum utilisé. Nous verrons plus loin que cette condition est effectivement remplie.

Nous avons dilué le sérum de concentration $200 + x$ mg. au litre, de 2 à 18 fois à l'eau distillée et nous avons bien obtenu une courbe superposable à la précédente aux erreurs d'expérience près. Notre courbe doit donc être utilisable (fig. 9).

Remarquons la forme particulière des courbes obtenues avec une solution artificielle de bilirubine dans le sérum et avec un sérum concentré dilué à l'eau salée : la courbe d'étalonnage présente une courbure très marquée à concavité inférieure; la courbure est presque aussi accentuée si l'on porte les absorptions en ordonnées au lieu des déviations, elle l'est à peine moins si l'on porte les densités optiques. Ainsi donc les densités optiques ne sont pas proportionnelles aux concentrations et pour trouver le début de la courbe (valeur nulle de bilirubine ajoutée, concentration variant de 0 à x), il faut bien se garder d'extrapoler par application de la loi de Beer; on ne peut le faire qu'à partir de la courbe expérimentale.

Cette non proportionnalité des densités optiques aux concentrations pourrait s'expliquer par un changement de couleur de la bilirubine avec la dilution, produisant un décalage de la courbe d'absorption dans

le spectre. D'autre part la lumière employée n'étant pas strictement monochromatique le coefficient d'absorption diminue au fur et à mesure que la concentration augmente, par effet de filtre. Par ailleurs, la forme de la courbe spectrale de sensibilité des cellules peut jouer un rôle important dans ce phénomène.

Il faut remarquer par conséquent que la concentration en bilirubine ne pourra être évaluée avec quelque précision qu'entre certaines limites de concentration. En effet pour une concentration trop faible, la précision des mesures sera elle-même faible et pour une concentration trop forte la variation de cette concentration en fonction de l'absorption est trop grande de telle sorte qu'une toute petite erreur commise sur l'absorption peut donner lieu à une erreur de 200 p. 100 sur la concentration: il faudra donc toujours diluer les sérums à examiner de façon que leur couleur se rapproche de celle d'un sérum normalement chargé en bilirubine et que son absorption se situe sur la courbe d'étalonnage dans la région la plus favorable, aux environs de 25 p. 100 d'absorption.

Pour une erreur de lecture de 1 division, correspondant à peu près à 1 % d'absorption avec le réglage choisi, la concentration estimée d'après la courbe, varie comme on le voit sur le tableau ci-dessous.

Absorptions %	Concentrations	Erreurs
25 à 26	3,5 — 3,5	= 0
50 à 51	13 — 12 +	= 1-
60 à 61	20 — 19	= 1
70 à 71	26,5 — 25	= 1,5
75 à 76	36 — 33,5	= 2,5
80 à 81	50 — 46,5	= 3,5
86 à 87	200 — 100	= 100 mg.

Il faut donc opérer sur des sérums peu concentrés donnant en moyenne une absorption de 25 p. 100. Dans ces conditions on peut utiliser sans erreur et pour des sérums différents, la courbe d'étalonnage.

2) MESURE PAR REACTION AU DIAZONIUM.

On peut se proposer maintenant de comparer les résultats que nous avons obtenus par cette méthode pour les concentrations en bilirubine avec ceux obtenus par la méthode de VAN DEN BERGH (7) (8). Pour cela nous avons examiné le sérum, enrichi de façon variable en bilirubine, qui a servi à établir la courbe d'étalonnage et nous avons procédé pour ces sérums, dilués à des taux variables, à l'épreuve de VAN DEN BERGH telle que nous avons l'habitude de la pratiquer au laboratoire, pour la recherche de la bilirubine indirecte.

Technique : A 2 cc. d'alcool à 96° on ajoute 1 cc. de sérum, on centrifuge et on prélève 1 cc. du filtrat alcoolique auquel on ajoute 0,25 cc. de réactif et 0.5 cc. d'alcool à 96°. Au bout de 3 minutes on compare aux étalons colorés.

Le réactif est préparé extemporanément par mélange de 0 cc. 3 de solution B à 10 cc. de solution A.

La solution B est une solution à 0,5 p. 100 de nitrite de soude dans l'eau distillée.

La solution A contient :

1 g. d'acide sulfanilique

15 cc. d'une solution d'HCl à 25 p. 100

De l'eau distillée q. s. p. 1000 cc.

Les résultats de la méthode de VAN DEN BERGH sont un peu inférieurs à ceux que nous donne notre méthode. Ceci peut s'expliquer aisément par la fixation de bilirubine sur le précipité protidique comme le confirme l'examen de la colonne 4 comparative-ment à la colonne 3 du tableau représentant les absorptions procentuelles des filtrats alcooliques d'une part et des sérums correspondants d'autre part. Les chiffres de la colonne 4 sont aussi indiqués par la courbe n° 3 de la figure 9. En effet chaque filtrat alcoolique présente une absorption procentuelle inférieure à celle du sérum correspondant, compte tenu de la dilution.

Cette diminution de l'absorption est faible, elle correspond à une baisse de la concentration en bilirubine de 1 à 2 mg. au litre. Notons de plus que cette quantité est à peu près constante. Ces résultats s'expliquent en admettant que la bilirubine ajoutée au sérum in vitro se comporte comme de la bilirubine indirecte

Colonne 1	2	3	4	4 bis	5
Concentrations réelles en mg. de bilirubine par litre	Absorption procentuelle	Concentr. lues sur la courbe	Absorption du filtrat	Concentr. du filtrat	Concentr. données par la méth. V. D. BERGH
$c = \frac{100}{18} = 5,55$	27,5	4	25	3,5	3
$c = \frac{100}{15} = 6,65$	30	4,5	29	4	4
$c = \frac{100}{12} = 8,31$	35,5	6,5	35	6 +	6
$c = \frac{100}{9} = 11,5$	42	9	42	9	9
$c = \frac{100}{6} = 16,6$	53	14	52	13,5	13
$c = \frac{100}{5} = 20$	58,5	18			18
$c = \frac{100}{4} + \frac{x}{8} = 25$	64,5	23,5			20
$c = \frac{100}{3} = 33,3$	72,5	33,3	68	28,5	40
$c = \frac{100}{2} + \frac{x}{4} = 51$	80	47			55
$c = 100 + \frac{x}{2} = 103$	85,5	93			

dont l'une des propriétés est de ne se fixer qu'en quantité faible sur le précipité de protéines.

Ce que nous venons de dire est vrai pour les concentrations inférieures à 25 mg par litre mais semble ne pas le rester pour les concentrations plus grandes; mais ces concentrations trouvées par la méthode de VAN DEN BERGH ne sont pas valables parce qu'elles ont été recherchées sur des sérums beaucoup trop concentrés; d'ailleurs les concentrations des filtrats restent inférieures à celles des sérums correspondants. Pour rechercher la concentration des sérums concentrés par la méthode de VAN DEN BERGH d'une manière correcte il faut les diluer mais nous retombons évidemment sur les cas précédents (8).

Mais il s'agit maintenant de savoir si cet accord subsiste dans tous les cas et en particulier lorsque la bilirubine au lieu d'être ajoutée au sérum *in vitro* se trouve à l'état naturel dans le sérum. Nous avons dans ce but examiné un certain nombre de sérums *naturellement* chargés de façon variable en bilirubine et nous en avons déterminé, comme précédemment, la concentration par la méthode de VAN DEN BERGH d'une part et par la nôtre d'autre part, en nous servant de notre courbe d'étalonnage.

L'accord qui était relativement bon dans le cas précédent va-t-il subsister ? L'expérience montre que non et le désaccord entre les résultats donnés par les

deux méthodes est considérable ainsi que le met en évidence le tableau. Les résultats que nous obtenons sont supérieurs à ceux trouvés par la méthode de VAN DEN BERGH et les rapports entre les deux résultats n'ont aucune constance; nous voyons en particulier que les sérums n° 34 et 40 que nous trouvons très différents, avec des concentrations respectives de 50 et 68 mg. par litre, sont trouvés identiques par la méthode de VAN DEN BERGH.

Sérums N°	Concentration obtenue d'après la courbe	Concentration obtenue par la méthode de VAN DEN BERGH
	mg.	mg.
33	70	50
34	50	25
35	33	14
33 bis	80 à 85	50
35	4,5	2
36	9	4
37	55	40
38	11	1
37 bis	55 à 56	40
40	68	25
41	75	35

Pour expliquer les écarts de ces deux méthodes nous pouvons envisager les possibilités suivantes :

L'évaluation colorimétrique n'est pas correcte.

a) Parce qu'il existe d'autres matières colorantes dans le sérum tels que les lipochromes et les caroténoïdes ce qui n'est pas rare dans ces temps de disette où l'alimentation peut être anormalement chargée en

carotène par ingestion en plus grande quantité de carottes, de tomates ou d'épinards.

b) Parce que la bilirubine se trouve sous des formes colorimétriquement différentes; soit que la bilirubine subisse des modifications chimiques et qu'elle puisse exister par exemple à l'état plus ou moins condensé, polymérisé ou bien encore qu'elle s'accrole à une molécule de protéine, de globine par exemple comme le pensent le Professeur Noël FIESSINGER, le Professeur POLONOWSKI et le Docteur GAJDOS; soit encore qu'elle subisse des modifications physiques telles que l'adsorption sur les protéines.

Pour le savoir d'une manière indubitable, il serait nécessaire de faire la spectrophotométrie du sérum (9) et de vérifier la similitude des courbes spectrales d'absorption, mais on peut, d'une manière moins correcte vérifier la similitude pour divers sérums des courbes absorptiométriques en fonction de la dilution.

Nous avons examiné une série de sérums que nous avons dilués et dont nous avons mesuré les absorptions relatives *par les méthodes absorptiométriques usuelles* et la figure n°12 met en évidence les résultats que nous avons obtenus : on y voit, d'une part, la courbe d'éta-lonnage de la bilirubine établie à partir d'un sérum sanguin (sérum n° 14) dilué 2 fois auquel on a ajouté des quantités croissantes de bilirubine et, d'autre part, quelques exemples choisis parmi une famille de cour-bles colorimétriques.

La courbe n° 4 est celle du sérum n° 2 dilué 4 fois, ce sérum ainsi dilué présente une absorption de 60 p. 100 ce qui correspond d'après notre courbe d'étalonnage à une concentration de 50 mg. par litre; en nous

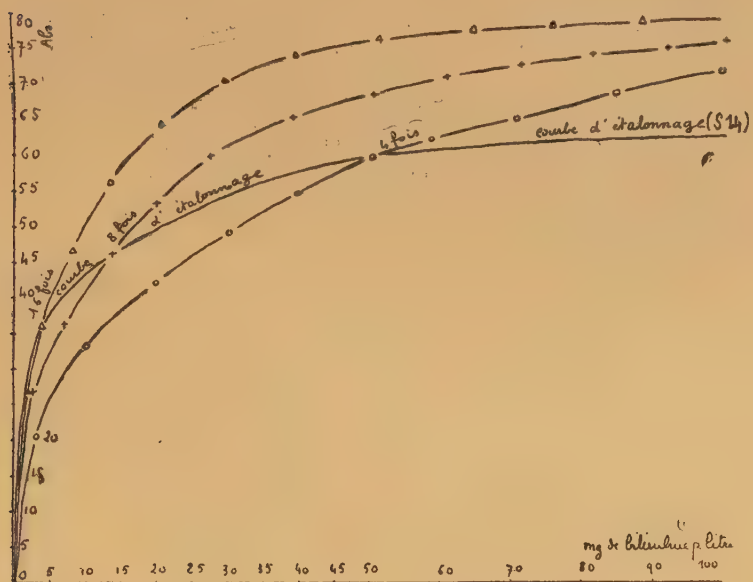


Figure 12

servant de cette concentration comme base nous avons établi la courbe des absorptions en fonction des concentrations que l'on en déduit : ainsi puisque le sérum dilué 4 fois renferme 50 mg. par litre, celui qui n'est dilué que 2 fois renferme 100 mg. par litre etc... et celui qui n'est pas dilué renferme 200 mg. par litre.

La courbe n° 8 représente la courbe colorimétri-

que établie à partir du sérum dilué 8 fois de la même manière. Il en est de même de la courbe 16.

L'allure très différente de ces courbes, établies, répétons-le, par les méthodes absorptiométriques usuelles montre que la courbe d'étalonnage établie dans ces conditions est inutilisable.

Cependant ces anomalies pouvant s'expliquer dans une large mesure par l'effet considérable de la turbidité du sérum, il était nécessaire de reprendre ces essais avec le comparateur colorimétrique à sphère.

Nous avons alors établi les courbes colorimétriques d'un grand nombre de sérums sanguins avec cet appareil, en lumière bleue. Nous avons ici déterminé les concentrations de base *par la méthode de VAN DEN BERGH*. Les figures 13 et 14 représentent les courbes colorimétriques des absorptions en fonction des concentrations (des dilutions). On voit qu'elles sont très dissemblables. Les courbes colorimétriques des filtrats alcooliques correspondants sont également dissemblables et de plus le rapport des absorptions des filtrats aux absorptions des sérums correspondants dilués un même nombre de fois est variable. En outre, pour chaque sérum ce rapport varie plus ou moins avec le taux de dilution. Voici quelques-uns de ces rapports :

Pour le sérum n°	13 :	$\frac{\text{absorption sérum}}{\text{absorption plasma}} = 1,3$
—	14 :	— = 2,4
—	15 :	— = 2
—	16 :	— = 1 à 1,7
—	17 :	— = 2 à 2,5
—	18 :	— = 2,5 à 2,67
—	19 :	— = 2,0 à 4,9
—	22 :	— = 0,99 à 1,9
—	23 :	— = 0,99 à 1,5

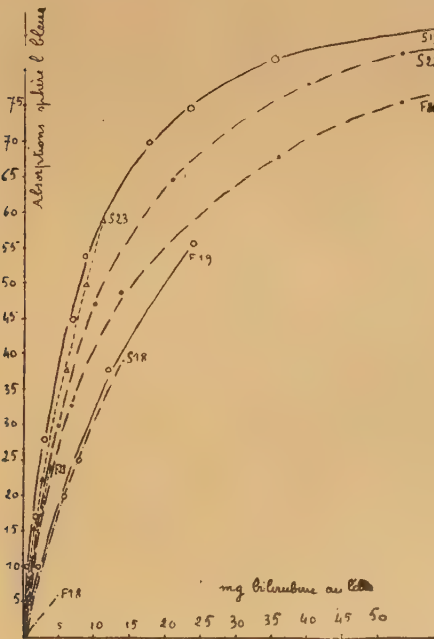


Figure 13

Ces résultats nous amènent à penser que l'écart des deux méthodes envisagées est dû à la fixation d'une

quantité de bilirubine, variable et souvent importante sur le précipité de protéines. La méthode de VAN DEN BERGH ne peut pas être considérée comme un étalon.



Figure 14

Notons en passant que ce rapport peut donner une idée des proportions relatives de bilirubine directe et indirecte puisque cette dernière ne se fixe qu'en très petite quantité (10).

Nous avons enfin établi un certain nombre d'autres courbes colorimétriques mais ici nous avons déterminé la concentration de chaque sérum d'après notre courbe d'étalonnage qui a été évidemment établie dans les mêmes conditions c'est-à-dire au comparateur colorimétrique à sphère, en lumière bleue.

La concentration du sérum ainsi déterminée, nous avons dilué nos sérums et tracé pour chacun d'eux les courbes des absorptions en fonction des dilutions (concentrations déduites des taux de dilution et de la concentration initiale trouvée). La figure 15 représente le faisceau de courbes obtenues.

Evidemment confondues à l'origine, elle sont encore presque confondues pour une absorption de 5 p. 100 pour laquelle l'erreur absolue commise est de 0,5 mg. par litre. Les courbes divergent ensuite, l'erreur absolue croît et pour une absorption de 35 p. 100 l'erreur maxima est de 14 mg. (de 16 à 30 mg. au litre), pour 40 pour 100 elle est de 30 mg. (50 à 60 mg. au litre).

Mais la divergence apparente de ces courbes provient du fait que nous avons pris comme base de comparaison la concentration des sérums initiaux, choisis très riches en bilirubine; or, nous avons montré précédemment l'erreur considérable qui pouvait être faite dans ce cas. Si nous prenons maintenant comme base de comparaison des dilutions correspondantes et con-

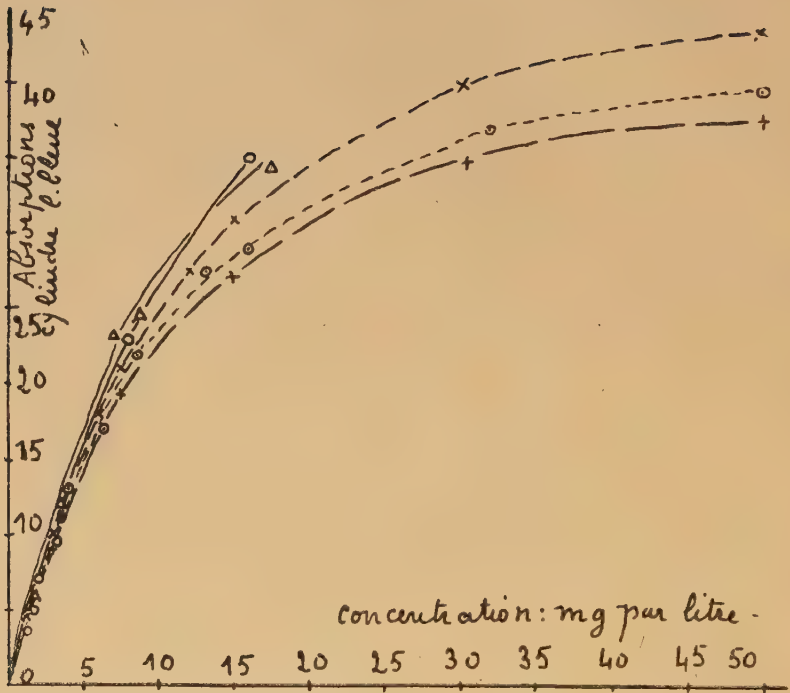


Figure 15

venables nous voyons que la coïncidence des courbes devient satisfaisante comme le montre la figure 16.



Le tableau suivant montre par quelques exemples la divergence des valeurs obtenues pour les concentrations quand on prend comme base de comparaison des taux différents de dilution des différents sérums examinés.

Taux de dilution	Sérum n° 1	2	3	4
16		19		
10		18		
8		18		4,8
7				4,5 à 4,9
6	31,2 à 31,4	18 à 19,2	5,7	4,8
5		20 à 21,5	6	5
4	32	21,6 à 22,4	6,8	5,6
3	32,4	21,3 à 21,9	6,3	5,7
2	31		7,2 à 7,9	6,4
1	32		7,5	7,2

Le sérum n° 2 était trouble et de plus de couleur orangée et on constate que sa courbe colorimétrique ne diffère que peu de la courbe d'étalonnage. On remarque d'autre part que l'on trouve toujours un résultat supérieur ou égal en recherchant la concentration directement avant toute dilution, jamais inférieur; ceci a été vérifié sur un grand nombre de sérums. La différence entre tous les chiffres trouvés pour un même sérum ne semble donc *pas attribuable uniquement* à l'erreur provenant de ce qu'on est amené ici à utiliser une mauvaise région de la courbe. On pourrait penser qu'un sérum comme le sérum n° 1 dont la courbe colorimétrique se superpose à la courbe d'étalonnage ne

contient que de la bilirubine indirecte puisque, nous l'avons vu, la bilirubine ajoutée au sérum se comporte comme telle, et pour la même raison, on pourrait penser que les sérums tels que les n° 2, 3 et 4 contiennent de la bilirubine directe et ce, en quantité d'autant plus grande que l'écart est plus grand entre les deux courbes. Il faudrait pouvoir établir une courbe d'étalonnage avec de la bilirubine directe; la forme de la courbe de dilution d'un sérum pourrait donner des indications sur les proportions des deux bilirubines en présence.

Mais cette légère différence dans la forme des courbes colorimétriques pourrait être due aussi à la présence de carotène. Notons d'ailleurs que, même si les courbes de dilution présentent la même forme, il est intéressant de rechercher les taux normaux et anormaux de la carotinémié et de voir si celle-ci entraîne une grosse erreur puisque l'on dose ensemble la bilirubine et le carotène.

Nous avons pour cela examiné un grand nombre de sérums en nous servant de la courbe d'étalonnage établie au laboratoire par le Docteur TORRES, avec la technique suivante :

A 4 cc. de plasma sanguin on ajoute 4 cc. d'alcool à 96° et 10 cc. d'éther de pétrole (35 à 50°). On agite violemment pendant 10 minutes et on centrifuge. Dans ces conditions il se forme trois couches : une couche superficielle d'éther de pétrole ayant dissous

les carotènes, une couche intermédiaire de précipité protidique et une couche inférieure alcoolique contenant en dissolution la bilirubine.

Comme l'éther de pétrole n'est miscible ni à l'alcool ni au sérum les carotènes qui étaient contenus dans 4 cc. de plasma sont passés dans les 10 cc. d'éther de pétrole et se trouvent dilués 2 fois et demie.

Pour les nombreux sérums examinés les absorptions, compte tenu des dilutions, nous donnent des taux de carotène compris entre 250 et 800 γ par litre, mais pour la très grande majorité ce taux est compris entre 400 et 600 γ *par litre*.

Nous avons tracé sur le même graphique les courbes d'étalonnage établies à l'absorptiomètre et dans les mêmes conditions (en lumière bleue et avec la grille n° 1 réglée à 10) des caroténoïdes, d'une part et de la bilirubine de l'autre, de sorte que l'on peut lire directement sur la courbe l'erreur entraînée par la présence du carotène. Une solution de carotène à 500 γ par litre est optiquement équivalente dans les conditions considérées à une solution à 0 mg. 45 de bilirubine au litre. On voit par conséquent que l'erreur due au carotène est négligeable dans la grande majorité des cas; d'ailleurs lorsqu'il y a vraiment une caroténémie importante, on en est averti par la teinte spéciale des téguments du malade et par la couleur orangée caractéristique du sérum.

Dans ces conditions nous opérerons de la façon suivante :

1°) Nous mesurerons l'absorption directement, puis à titre de contrôle

2°) Nous mesurerons l'absorption après une dilution convenable puis

3°) Nous rechercherons la concentration en carotène comme il a été dit.

Il suffira alors de retrancher du taux global trouvé, le taux de bilirubine correspondant absorptiométriquement au carotène.

ESSAI DE DISTINCTION DES BILIRUBINES DIRECTE ET INDIRECTE. (11) (10) (12)

1 — Par colorimétrie directe du sérum sanguin nous avons dosé la *totalité de la bilirubine* : directe et indirecte, mais nous n'avons qu'une idée très peu précise du rapport qui existe entre les deux.

2 — La méthode de VAN DEN BERGH telle que nous l'employions était longue, fastidieuse et, de plus, sa précision n'était pas très grande.

Nous avons essayé d'adapter le procédé des américains MALLOY et KENNETH A. EVELYN (13) qui recherchent le taux de *bilirubine indirecte* sans précipitation, par diazotation et comparent colorimétriquement le tube diazoté à un témoin.

Technique : on fait un tube témoin qui contient :

5 cc. d'alcool méthylique absolu

1 cc. d'HCl au 1/4

4 cc. de sérum dilué 10 fois

L'autre tube contient :

5 cc. d'alcool méthylique absolu

1 cc. de Diazo-réactif

4 cc. de sérum dilué 10 fois.

L'avantage de cette méthode est d'éviter l'erreur due à la perte d'une partie de la bilirubine par fixation sur le précipité d'albumines; en effet cette technique évite toute précipitation. De plus, ces auteurs ont montré que l'on pouvait dans ces conditions doser la bilirubine indirecte contrairement à ce qu'avait pensé VAN DEN BERGH.

Ainsi nous avons deux tubes bien comparables; la seule différence est que le premier est coloré par la bilirubine (et par le carotène s'il y en a en quantité appréciable) tandis que le deuxième est coloré par l'azobilirubine provenant de sa transformation (et par le carotène également). Dans ces conditions le carotène n'intervient pas puisqu'il existe également dans les deux tubes que l'on aura à comparer. On règle l'absorptiomètre au zéro avec le premier tube qui est donc ainsi utilisé comme base colorimétrique. A chaque concentration en bilirubine connue par un étalonnage précédent correspond une absorption particulière

et l'azobilirubine provenant de la transformation de la bilirubine entraîne une absorption qui est fonction de sa concentration. On a dressé une courbe d'étalonnage des absorptions (des solutions diazotées par rapport aux solutions témoin) en fonction des concentrations en bilirubine. On a opéré en lumière verte c'est-à-dire dans la région du maximum d'absorption de la diazobilirubine.

On a choisi un certain nombre de sérums parmi ceux que l'on a examinés et on a réuni dans le tableau suivant les résultats obtenus pour les concentrations :

1°) Par notre méthode habituelle de dosage de la bilirubine indirecte à la sphère d'intégration en lumière bleue.

2°) Par la méthode d'EVELYN, MALLOY, etc...

3°) Nous avons noté enfin les absorptions des sérums diazotés par rapport aux témoins, mesurées à la sphère d'intégration en lumière verte également; pour cette dernière colonne on voit que la sensibilité de la sphère n'est pas suffisante et qu'il faudrait reprendre ces expériences avec un dispositif plus sensible puisque nous avons vu que c'est le seul moyen que nous ayons de faire de la colorimétrie correctement.

Sérum N°	Concentration déterm. par colorimétrie dir. par le comparateur à sphère en lum. bleue	Par la méth. d'EVELYN à à l'absorpt. en lum. verte	Absorpt. par la sphère en lum. verte
*1	*10	*7	*1,5
2	50	51	6,5
3	16	16	2,5
4	60	57,5	7
*5	* 64	*38	*7,5
* 6	*35	*14	*1 ?
7	4	3,5	?
8	5	4,5	?
9	5,5	5	?

Nous avons constaté que si la méthode évite la précipitation des protéines il n'en est pas moins vrai qu'il existe souvent une turbidité prononcée et qui n'est pas nécessairement la même dans les deux échantillons. On voit que les résultats coïncident souvent mais il est aussi des cas où ils ne coïncident pas du tout (*) et l'erreur de diffusion ne semble pas suffisante pour expliquer de tels écarts. Ceux-ci sont vraisemblablement dûs à la présence de bilirubine directe en grande quantité; le fait que nous trouvons des chiffres supérieurs permet de faire cette supposition.

3 — Pour la recherche de la bilirubine directe, MALLOY et EVELYN (13) se servent de la réaction recommandée par VAN DEN BERGH et dont voici la technique :

A 1 cc. de sérum on ajoute 2 cc. de Diazoréactif.

On laisse 15 minutes à l'abri de l'air.

On ajoute 2 cc. d'eau distillée puis une solution alcoolique tampon jusqu'à 10 cc.

On attend 15 minutes avant de lire le résultat.

On compare comme dans le cas précédent au tube témoin et on se reporte à la courbe d'étalonnage.

La question du dosage des deux bilirubines dans le sérum semble pouvoir être résolue par l'étude cinétique de la réaction de diazotation.

VAN DEN BERG (10) a imaginé de se servir d'un colorimètre type Dubosq.

A droite, on a du Diazoréactif (viré au rose) dans une grande cuve B dans laquelle on peut faire plonger plus ou moins profondément une petite cuve A de sérum pur.

A gauche, on a du sérum auquel on ajoute le diazoréactif. Au moment où l'on ajoute le diazoréactif le sérum est jaune.

A droite, la cuve A étant au fond de la cuve B. l'œil ne voit que le sérum jaune, on note la hauteur de la cuve A : 0.

Puis à gauche le sérum vire au rose par diazotation, il faut alors relever la cuve A pour que l'œil perçoive la couleur rose. On note régulièrement la hauteur dont il faut élever la cuve A pour conserver l'égalité de teinte des deux côtés. On établit une courbe des hauteurs en fonction des temps notés :

1) *Pour les sérums à réaction directe*, le sérum vire très rapidement au rose ce qui se traduit par une courbe très rapidement ascendante; ensuite on ne note plus d'augmentation sensible et cela se traduit par un plateau.

2) *Pour les sérums à réaction indirecte*, au contraire, on doit attendre plus ou moins longtemps avant de voir la couleur du sérum virer au rose; cela se traduit par une courbe confondue avec l'axe des abscisses, puis le virage se produit lentement et la courbe devient lentement ascendante.

HARTOG, avec VAN DEN BERGH (14), a montré que les réactions représentées par ces graphiques de vitesse sont du type monomoléculaire et il en résulte que si on porte les logarithmes des valeurs obtenues en ordonnées, on obtient des droites; l'angle qu'elles forment avec l'axe des ordonnées mesure alors la vitesse de réaction.

Pour les sérums contenant un mélange des deux bilirubines on a une ligne brisée et si A est le point de rencontre avec l'axe des ordonnées, B le point de brisure et D le point de rencontre du prolongement de la deuxième partie B C de la ligne brisée avec l'axe des ordonnées :

oA donne la concentration en bilirubine directe.

oD donne la concentration en bilirubine indirecte.

$\frac{oA}{oD}$, le rapport des deux, est intéressant aussi à considérer en clinique

Nous pourrions adapter cette méthode à nos appareils de mesures : absorptiomètre et, mieux encore colorimètre à sphère qui permettraient de faire une étude cinétique dans de bonnes conditions. Il suffirait d'ajouter le diazoréactif au sérum et de régler à ce moment l'appareil au zéro puis de suivre à intervalles réguliers les variations de l'absorption.

Les dispositifs photoélectriques rendant très facile l'étude précise de la cinétique des réactions colorées, il serait intéressant de les adapter à la méthode précédente. En outre comme nous l'avons déjà fait remarquer, il est possible qu'il existe une différence de teinte entre la bilirubine directe et la bilirubine indirecte qui pourrait alors être révélée par une méthode spectrométrique précise.

CONCLUSIONS

I. — Les méthodes absorptiométriques ou colorimétriques usuelles dans le plasma sanguin et dans des liquides semblables sont souvent faussées par l'existence de la turbidité.

II. — Cet inconvénient est spécialement sensible avec les comparateurs photoélectriques généralement employés à l'heure actuelle.

III. — On étudie les dispositifs propres à évaluer cette turbidité d'une part et à permettre d'autre part des comparaisons colorimétriques ne comportant pas ces causes d'erreur.

IV. — Les variations rapides de la turbidité du plasma rendent souvent sujets à discussion les procédés colorimétriques qui utilisent comme base le plasma prélevé lors de la première prise de sang.

V. — On étudie les possibilités du dosage correct de la bilirubine dans le sérum sanguin par colorimétrie photoélectrique. Ces procédés donnent des résultats

qui ne sont pas toujours en accord avec les procédés indirects de diazotation généralement employés. Les causes d'erreur inhérentes à ces dernières sont discutées.

Vu

Le Doyen :
BAUDOUIN

Vu

Le Président de la Thèse :
N. FIESSINGER

Vu et Permis d'Imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris :
G. GIDEL

BIBLIOGRAPHIE

- CASTAIGNE. — Le dosage de la bilirubine du sang. — Ses applications cliniques. (*Journal médical français*, décembre 1934, 397-399).
- CASTAIGNE. — La diazoréaction dans le dosage de la bilirubine. (*Journal médical français*, p. 400-407, décembre 1934).
- CASTAIGNE. — L'importance de la recherche de la cholémie pigmentaire en médecine pratique. (*Journal médical français*, décembre 1934, p. 422-430).
- CHABROL, BUSSON. — La diazoréaction limite — Sa technique — Ses applications. (*Journal médical français*, p. 408-412, décembre 1934).
- CHABROL, BUSSON. — Comment doser la bilirubine dans le sang, les urines et le liquide duodénal. (*Journal médical français*, p. 418-421, décembre 1934).
- A. COLANGIULI et P. FRANZINI. — Determination in normal and pathologic body fluids. (*Diag. e. tec. di lab.*, tome 7, page 169-176, mars 1936).
- (3) A. DOGNON. — Diffuso absorptiomètre à cellules photovoltaïques. (*Comptes rendus des séances de la société de Biologie*, 22 avril 1939, Tome CXXX, année 1939, p. 1481).
- (4) A. DOGNON. — Colorimétrie en milieu trouble. — (*Comptes rendus des séances de la société de Biologie*, 8 février 1941, tome CXXXV, année 1941, p. 113).

- (5) A. DOGNON, Y. SIMONOT. — La diffusion de la lumière et la colorimétrie photoélectrique du sérum sanguin. (*Comptes rendus de la société de Biologie*, tome CXXXV, année 1941, page 146).
- (11) Noël FIESSINGER, JOURDAIN, TOISOUL. — Contribution à l'étude de la bilirubine dissimulée en circulation sanguine. (*Presse médicale*, n° 77 du 27 septembre 1929).
- (12) Noël FIESSINGER. — La bilirubinémie dissimulée ou indirecte et la bilirubinémie franche ou directe en pathologie hépatique. (*Revue Le Sang*. Tome X, n° 8, 1936).
- Noël FIESSINGER. — Quelques considérations sur l'origine et sur l'équilibre des deux bilirubines. T. 43, n° 5, mai 1938, *Revue Le Sang*.
- Noël FIESSINGER. — Bilirubine dissimulée.
- Noël FIESSINGER et Michel ALBEAUX-FERNET. — Contribution à l'étude de la photométrie électrique du plasma sanguin. (*Revue Le Sang*. T. XIII, n° 4, pages 456-462).
- (7) FOWWEATHER. — Bilirubin and the Van den Bergh reaction. (*Biochimic Journal* — vol. XXVI, n° 1, p. 165-182 — Cambridge 1932).
- (9) HEILMEYER et KREBS. — Biochimische Zeitschrift. — Examen spectrophotométrique du pigment d'azobilirubine d'Erhlich PRÖSCHER et son emploi pour le dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin. (*Clinique Médicale de l'Université d'Iéna*).
- (6) HEILMEYER. — *Medizinische Spectrophotometrie Fischer*. Iéna.
- (1) Louis LAUR. — Les techniques de Bilirubimétrie plasmatique. — Leur comparaison. — (*Thèse pour le Doctorat* 1930).

(2) LAURENT GERARD P. — Dosage colorimétrique en lumière monochromatique de la cholestérine, du glucose, de l'acide urique et de l'hémoglobine. (*Extrait des comptes rendus des séances de la Société de Biologie*, 5 mai 1928, tome XCVIII, p. 1325).

MAGATH et SCHEARD. — *Archives int. Medecine expérimentale*, t. 3, 1927.

MAGATH et SCHEARD. — *Archives of international médecine*, t. 39, 1927.

(13) H.-Z. MALLOY et KENNETH A. EVELYN. — *Journal of biology Chemistry* — tome 119 — p. 481-490, 1937.

H. P. MALLOY et K. A. EVELYN. — Determination oxydation method for bilirubin determination in bile and meconin with photoelectric colorimeter. (*Journal Biol. Chem.*, 1922, pages 597-603, février 1938).

MATHIEU. — (*American Journal Physiologie* — tome 98, 1931).

MULLER (P.) u EUGEL (L.). — (*Verhandlg Deutsch Ges f inn Medecine* — 1931).

Ch. RAHIER. — *Comptes rendus. Société de biologie*, Paris, t. 101, 1929.

SALA ROIG. — La bilirubinemia i el rosa bengala en l'exploracio funcional del fetge. (*Annales de Medecina occitania*. Septembre 1930).

SCHEARD BALDES BOLLMAN. — *American Journal Physiologie*, tome 76, 1926.

SCHEARD, BALDES, MANN, BOLLMANN. — *American Journal Physiologie*, p. 131-183, tome 78, 1926.

Giulio SOTGIU. — L'Iperbilirubinemia adrenalina negli

- epatici. (*Diagnostica i tecnica di laboratorio* — mars 1934, XII. Napoli).
- VAN DEN BERGH and GROTEPASS. — An improved method for the determination of bilirubine in blood (*Reprinted form the British Medical Journal* — juin 1934, p. 1157).
- (8) VAN DEN BERGH EN GROTEPASS. — Verbeterde methode Van Bilirubine bepaling door. (*Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde*, janvier 1934).
- (10) VAN DEN BERGH et GROTEPASS et HARTOG. — Nouvelles études sur la bilirubine dans le sang. (p. 1 à 14). (*Revue Médicale de Spa*, 1934).
- (14) VAN DEN BERGH. — Mesure de la vitesse de réaction de la bilirubine directe et indirecte. (*Bulletin de l'Académie de Roumanie*, 1^{re} année, Tome II, n° 24).
- VARELA FUENTO. — Bilirubine indirecte et son extraction par le chloroforme. (*Comptes rendus. Société de Biologie*, tome CXVII, p. 903, 1934).
- O. WELTMANN et F. JOST. — Eine Verbesserung der quantitativen bilirubinbestimmung. (*Med. Klin*, 1928, n° 29, p. 1091).
- Neberdie adsorption des Bilirubins an das Eiweiss.
- Ihre Bestimmung und Klinische Verwertung. (*Deutsche Arch. f. Klin. Med.*, 1928, tome CLXI, n° 3-4, p. 203).
- F. WIMPLINGER. — Fonction of Kidney in oxydation processes in blood and bilirubin and resultant formation of pent dyspent. (*Ztschr. f. Klin. Med.*, 130, pages 720-724, 1936).

IMPRIMERIE R. FOULON
29, Rue Deparcieux, 29
P A R I S
